云 南 植 物 研 究 1999, 21 (1): 87~95
Acta Botanica Yunnanica

四药门花属及其近缘植物 ITS 区序列分析和系统学意义*

施苏华 黄椰林 章 群 金 虹 谈凤笑 张宏达
(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘要 测定和分析了四药门花等 13 种金缕梅科 (Hamamelidaceae) 植物的核糖体 DNA 转录间隔区 (ITS 区) 及 5.8S 编码区的序列。应用最大简约法构建的分子系统树表明: 被分析的金缕梅亚科 (Hamamelidoideae) 植物形成一个单系类群, 亚科内及其中的金缕梅族 (Hamamelideae) 内部呈复系演化 (polyphyletic) 的特征; 支持秀柱花族 (Eustigmateae) (含秀柱花属 *Eustigma*、牛鼻栓属 *Fortunearia* 和山白树属 *Sinowilsonia*) 成立以及将蚊母树族 (Distylieae) 与弗特吉族 (Fothergilleae) 合并的观点, 此结果与 Endress (1989) 系统接近; 金缕梅族中金缕梅属 (*Hamamelis*) 与弗特吉族中的弗特吉属 (*Forthergilla*)、银缕梅属 (*Shaniodendron*) 和水丝梨属 (*Sycopsis*) 系统发育关系密切; 四药门花属 (*Tetrathyrium*) 与檵木属 (*Loropetalum*) 属于同一个单系类群, 它们与 *Hamamelis* 的亲缘关系较远。

关键词 四药门花属, 金缕梅亚科, 系统发育, ITS 区, 核糖体 DNA
分类号 Q 943

Analysis of the Its Sequences of Nuclear Ribosomal DNA from *Tetrathyrium* (Hamamelidaceae) and the Related Genera and the Phylogenetic Significance

SHI Su-Hua HUANG Ye-Lin ZHANG Qun JIN Hong TAN Feng-Xiao ZHANG Hong-Da
(*School of Life Sciences, Zhongshan University*, Guangzhou 510275)

Abstract The sequences of the ITS regions and 5.8S coding region of nuclear ribosomal DNA from the genus *Tetrathyrium* and the related genera of Hamamelidaceae were determined and analysed. Based on the ITS sequences, the phylogeny of Hamamelidoideae was reconstructed, which was similar to Endress' system of Hamamelidaceae in 1989. It was shown that all the species of the subfamily Hamamelidoideae formed a monophyletic group in this study. However within both Hamamelidoideae and the tribe Hamamelideae, the polyphyly was indicated in the MPTs. The monophyly of the tribe Eustigmateae was strongly supported (including *Eustigma*, *Fortunearia* and *Sinowilsonia*). The ITS data supported Endress' treatment of merging the tribe Distylieae and Fothergilleae too. It was suggested that the genus *Hamamelis* was closely related to Fothergilleae in this study. *Tetrathyrium* and *Loropetalum* formed a monophyletic group.

Key words *Terathyium*, Hamamelidoideae, Phylogeny, ITS regions of ribosomal DNA

金缕梅科 (Hamamelidaceae) 是一个古老的、在被子植物起源与系统演化中具有重要

* 国家杰出青年科学基金 (39825104), 国家自然科学基金 (39970057) 和广东省自然科学基金 (970190) 资助项目
1998-10-07 收稿, 1998-11-30 接受发表

作用的关键科。全世界共30~32属约140种，分布于热带及亚热带。长期以来，有关金缕梅科的系统发育研究争议颇多。Harms（1930）、Bogle（1970）、张宏达（1979）和Endress（1989）等分别提出了各自的分类系统。金缕梅亚科（Hamamelidoideae）是金缕梅科中最复杂的、具有单胚珠、种系复杂而在近代获得较为良好发展的一个亚科，包括22个属，分属于4个族（Endress，1989），其族间及其属间的系统发育关系也一直是金缕梅类研究的热点。近年来，随着分子系统学研究的兴起与发展，利用DNA序列分析来探讨金缕梅科系统发育的工作已有报道（Shi *et al*，1998；李建华等，1997）。然而，在利用分子数据处理争议较大的金缕梅亚科内的系统演化关系上还有一些重要类群尚未涉及到。例如，四药门花属（*Tetrathyrium*）是一个我国特有属，在解剖学及形态学上被普遍认为是金缕梅亚科中最为原始的代表。过去曾被认为仅局限分布于香港，80年代后期在广西龙州和贵州荔波也发现其分布（张宏达等，1989）。该属形态学上的原始性状对研究金缕梅亚科的系统演化具有特别重要的意义，而分子数据尚未报道。在本研究中，我们首次测定了*Tetrathyrium subcordatum*的核糖体DNA（nrDNA）转录间隔区（ITS区）序列数据，结合其他相关类群，应用序列同源性比较和分支分析方法探讨了金缕梅亚科内的系统发育关系。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究中采用10个样品代表金缕梅亚科内主要的类群，3个样品作为复合外群组。具体种类及来源见表1。

1.2 实验方法

1.2.1 植物总DNA的提取与纯化　采用CTAB法（Doyle *et al*，1987）提取样品的总DNA，并用玻璃粉进行纯化。

1.2.2 ITS区片段的扩增与纯化　PCR反应过程以及所用引物参照Wen *et al*（1996）。PCR扩增产物采用Ultrafree－MC filters（Millipore）进行纯化。

1.2.3 序列测定　采用双脱氧链终止法（Sanger *et al*，1979），以$\alpha-{}^{35}S$－dATP作为放射标记，操作按T7 DNA sequence version 2.0 Kit（Amersham）说明书略加修改，分别采用引物N18L18、C5.8S、N5.8S、ITS4从两个方向进行测序（Wen *et al*，1996），得到整个ITS区及5.8S区的序列。测序反应产物用6%聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离，随后将胶转移到3 mm Whatman滤纸上，移至普通烘箱，50℃干燥3 h后压片，放射自显影。

1.2.4 数据处理　所测序列采用Clustal x程序（Thompson *et al*，1997）进行对位排列；PAUP 3.1.1软件包（Swofford，1993）在Macintosh IIci机上对序列进行统计分析和分支分析，计算各类群间的核苷酸差异数及差异校正值（Knuc值），采用最大简约法（maximum parsimony method）获得最大简约树（MPTs）；应用自展法（bootstrap）检验系统树，自展数据集为100次。分支分析中采用长柄双花木（*Disanthus cercidifolius* var. *longipes*）、红花荷（*Rhodoleia championii*）和北美苏合香（*Liquidamdar styraciflua*）作为复合外群组。

表 1 本研究所用金缕梅亚科和外类群的序列和样品来源（＊示该样品为本研究所测）。按张宏达 1979 系统

Table 1 Accessions of Hamamelidoideae and the complex outgroup sampled for the ITS studies (* represent the samples which were sequenced in this study). The classification system was based on H. T. Chang (1979)

Species	Subfamily	Voucher	Sequences and Geographical origin
Disanthus cercidifolius var. *longipes* 153*	Disanthoideae	R.Hao/974001	Cultivated in Zhongshan Botanical Garden, Nanjing, China
Rhodoleia championii 110*	Rhodoleioideae	F.Xing/6744	Da Wu Shan, Hong Kong, China
Hamamelis mollis 586	Hamamelidoideae	Y.Chen/586	Shi *et al*, 1998
Fothergilla major W48	Hamamelidoideae	J.Wen/48	Shi *et al*, 1998
Shaniodendron subaequale 151*	Hamamelidoideae	R.Hao /951004	Cultivated in Zhongshan Botanical Garden, Nanjing, China
Sinowilsonia henryi 156*	Hamamelidoideae	R.Hao/974003	Cultivated in Zhongshan Botanical Garden, Nanjing, China
Tetrathyrium subcordatum 218*	Hamamelidoideae	F.Xing/9271	Bowen Road, Hong Kong, China
Loropetalum chinense 65	Hamamelidoideae	X.Li/97004	Shi *et al*, 1998
Fortunearia sinensis 42	Hamamelidoideae	Y.Chen/42	Shi *et al*, 1998
Corylopsis claborescens 584	Hamamelidoideae	J.Wen/584	Shi *et al*, 1998
Sycopsis sinensis 102*	Hamamelidoideae	X.Li/97001	Cultivated in Zhongshan Botanical Garden, Nanjing, China
Eustigma oblongifolium 115*	Hamamelidoideae	F.Xing/6746	Da Wu Shan, Hong Kong, China
Liquidamdar styraciflua 581	Liquidambaroideae	J.Wen/581	Shi *et al*, 1998

表 2　四药门花属及其近缘植物 ITS 区序列距离矩阵，对角线下部为绝对距离；对角线上部为 Knuc 值；缺失位点不参与比较

Table 2 Kimura two-parameter sequence divergence values of taxa in *Tetrathyrium* and its related genera of Hamamelidaceae. Below the diagonal are the absolute distances; and above the diagonal are the Kimura two-parameter distances. Gaps were eliminated from the comparison

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. *D. cercidifolius* var. *longipes*	-	0.221	0.250	0.243	0.250	0.291	0.273	0.283	0.286	0.265	0.253	0.282	0.312
2. *R. championii*	160	-	0.276	0.264	0.271	0.285	0.283	0.290	0.282	0.276	0.278	0.286	0.305
3. *H. mollis*	176	194	-	0.020	0.033	0.107	0.117	0.126	0.104	0.101	0.034	0.102	0.265
4. *F. major*	176	191	14	-	0.033	0.104	0.122	0.120	0.098	0.102	0.037	0.099	0.251
5. *S. subaequale*	181	196	23	24	-	0.119	1.111	0.123	0.109	0.112	0.021	0.110	0.247
6. *Sin. henryi*	210	206	75	75	86	-	0.166	0.169	0.042	0.147	0.122	0.042	0.285
7. *T. subcordatum*	197	204	82	88	80	119	-	0.067	0.158	0.094	0.123	0.154	0.254
8. *Lor. chinense*	198	203	87	84	86	118	47	-	0.159	0.106	0.133	0.159	0.257
9. *For. sinensis*	207	204	73	71	79	30	114	111	-	0.140	0.116	0.035	0.282
10. *C. claborescens*	192	200	71	74	81	106	68	74	101	-	0.116	0.137	0.271
11. *Syc. sinensis*	183	201	24	27	15	88	89	93	84	84	-	0.112	0.253
12. *E. oblongifolium*	204	207	72	72	80	30	111	111	25	99	81	-	0.283
13. *L. styraciflua*	226	221	186	182	179	206	183	180	204	196	183	205	-

18S | ITS1

	1	1111111112	2222222223	3333333334	4444444445	5555555556	6666666667	7777777778
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
D. cercidifolius v.	TCGAAACCTG	CCCAGCAGAA	CGACCCGTGA	ACATGTATAA	ACT-CTCGTG	GGGGAGTGGA	GG GGGGGCA	TGCCTTCTCT
R. championii	TCGAAACCTG	CACAGCAGAA	CGACCCGCGA	ACCGGT- AA	AC CACGTTC	GGGCGGGAGC	GGGGGGTGCA	AGCCCTCTCT
H. mollis	TCGAAACCTG	CCCAGCAGAA	CGACCCGCGA	ACACGTATCA	A TGCTA-CG	GGG--GCGAG	GGG AGGCA	TGCCCCCTCT
F. major	TCGAAACCTG	CCCAGCAGAA	CGACCCGCGA	ACACGTATCA	A-TGCTA-TG	GGG GCGAG	GGG TGGGCA	TGCCCCCTCT
S. subaequale	TCGAAACCTG	CCCAGCAGAA	CGACCCGCGA	ACACGTATCA	A TGCCG-CG	GGG GCGAG	GGG AGGCA	TGCCCCCTCT
Sin. henryi	TCGAAACCTG	CCCAGCAGAA	CGACCCGCGA	ACACGTAACA	A-TGCTA-TG	GGG GCGAG	GGG AGGCA	TGCCCCCTCT
T. subcordatum	TCGAAACCTG	CACAGCAGAA	CGACCCGCGA	ACACGTAAAA	A CACAAGCC	GGG--GCGGG	GGG ATTC	CCC TCT
Lor. chinense	TCGAAACCTG	CACAGCAGAA	CGACCCGCGA	ACnTGTAT-A	nnCGCCAGTC	GGG GCGGG	GGGGAGTTCG	C CCTCGTCT
For. sinensis	TCGAAACCTG	CCCAGCAGAA	CGACCCGCGA	ACACGTAACA	A-TGCCA-TG	GGG--GCGAG	GGG- AGGCA	TGCCCCCTCT
C. elaborescens	TCGAAACCTG	CCCAGCAGAA	CGACCCGCGA	ACACGTAAAA	AATACAAGTG	GGG--GCGGG	GGGGCATTCG	TGCTCC TCT
Syc. sinensis	TCGAAACCTG	CCCAGCAGAA	CGACCCGCGA	ACACGTATCA	A-TGCTA-CG	GGG--GCGAG	GGG AGGCA	TGCCCCCTCT
E. oblongifolium	TCGAAACCTG	CCCAGCAGAA	CGACCCGCGA	ACACGTAACA	A-TGCCA-TG	GGG GCGAG	GGG AGGCA	TGCCCCCTCT
L. styraciflua	TCGATGCCTG	CACAGCAGAA	CGACCCGCGA	ACACGTATGA	AAACATCGGG	GGG GCG G	GGGGCGCG A	CGTCCTCTCC

			1	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111
	8888888889	9999999990	0000000001	1111111112	2222222223	3333333334	4444444445	5555555556
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
D. cercidifolius v.	CTCTCCTCCA	CCCGTCGGGA	TGCGCTTGGC	-CTCCGACCC	GCAA-CCCGT	GCCCTGCGCG	GGGAGCAT-C	GGCTCCAAC
R. championii	TCCTCCCGT	GTCGGGA	CGCGCTCGGC	ACCT--GCCC	GTGACCT-GC	GCGATGCGTG	CAGGGAGC C	GGTGCGTGTC
H. mollis	CTCCCCCAAA	GTCGGGA	CGCGCTCGGT	GCT-CGATCC	GCCAAC-CGT	GCCCCGTGCG	CGGG AAGC	ATCGG-CACC
F. major	CACCCCCAAA	GTCGGGA	CGCGCTCGGT	GCT-CGATCC	GCCAAC-CGT	GCCCCGTGCG	CGGG--AAGC	ATCGG CACC
S. subaequale	CTCCCCCAAA	GTCGGGA	CGCGCTCGGT	GCT-CGATCC	GCCGAC CGT	GCCACGTGCG	CGGG AAGC	ACCGG-CACC
Sin. henryi	CACCCCCAAA	GTCGAGA	CGCGTCCGGT	GCT- -----	-----	--	-	TCGG-CAAC
T. subcordatum	CGCCCCCAAA	G TCGGGA	CGCGCTCGnT	GCT-CGGTCC	GCAGCC-CGC	GCCACGTGCT	CGGG AAGC	CCCGT CCCC
Lor. chinense	CACCCCCAAA	GTCGGGA	CGCGCTCGGT	GCT-CGGTCC	GCGACC CGT	GCCACGTGCT	CGGG--AAGC	CnnGGTCCCC
For. sinensis	CACCCCCAAA	AGTCGGGA	CGCGTCCGGT	GCT ----	------ --			TCGG CAAC
C. elaborescens	CACCCCCAAA	A TCGGGA	CGCGCTCGGT	GCT-CGATTA	GCAACG-CGT	GCCTCGTGCA	CGGG -AAGC	TTCGG TGCC
Syc. sinensis	CTCCCCCAGA	GCCAGGA	CGCGCTCGGT	GCT CGATCC	GCCAAC-CGT	GCCACGTGCG	CGGG AAGC	ACCGG CACC
E. oblongifolium	CACCCCTAAA	GTCGAGA	CGCGTCCGGT	GCT	-	-- - --		TCGG-CAAC
L. styraciflua	CCTCCTC	GCCGGGA	AGCGGCGGGT	GCG CAGCGT	GCCCCT CG	ACCACGGGTT	GGGGGAAAGC	GCCGGTGCTT

	1111111111	1111111111	1111111111	1111111112	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222
	6666666667	7777777778	8888888889	9999999990	0000000001	1111111112	2222222223	3333333334
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
D. cercidifolius v.	G CATTCC	CGAT CACA	CAACGAACCC	CGGCGCAAAA	CGCGCCAAGG	AAACTGTAA-	CGCAAGAGCA	TGAGCCCCCG
R. championii	GGTGCGCTCC	CGATACACAA	CAACGAACCC	CGGCGCAAAA	CGCGCCAAGG	AA-CTCTAA	CGCAAGAGCA	TGCCCCCTTG
H. mollis	GGCGTGCGCT	CGAnAT CA	CAACGAACCC	CGGCGCAAAA	CGCGTCAAGG	AAAC-GCAA	CGCAAGAGCC	CGCTC CCA
F. major	GGCGTGCGCC	CGGCAT CA-	CAACGAACCC	CGGCGCAAAA	CGCGTCAAGG	AAAC-GCAA-	CGCAAGAGCC	TGCTC CCA
S. subaequale	GGCGTGCGCC	CGGCAT CA-	CAACGAACCC	CGGCGCAAAT	CGCGTCAAGG	AAAC-GAAA-	CGCAAGAGCC	CGCTC CCA
Sin. henryi	GCCGTGCTCT	CGACAT CA-	CAACGAACCC	CGnCGCAAAA	CGCGTCAAGG	AAAC-GCAA-	nGCAAGAGCA	TGCTC CCA
T. subcordatum	GTCGCGCTCT	CGATCT-CA	CAACGAACCC	CGGCGCAAAA	CGCGTCAAGG	AATC-TCAA-	CGCAAGAGCG	TGCTC CCA
Lor. chinense	GTCGTGCTCT	CGATCT CA	CAACGAACCC	CGGCGCAAAA	CGCGTCAAGG	AATC TCAA	TACAAGAGCG	TGCTC- CCA
For. sinensis	GGCGTGCTCC	CGGTAT CA	CAACGAACCC	CGGCGCAAAA	CGCGTCAAGG	AAAC-GCAA-	TGCAAGAGCA	TGCTC- CCA
C. elaborescens	GTCGTGCTCT	CGATCT-CA	CAACGAACCC	CGGCGCAAAA	CGCGTCAAGG	AATC-TAAAA	TGCAAGAGCG	TGCTC CCA
Syc. sinensis	GGCGTGCCCT	CGGCAT-CA-	CAACGAACCC	CGGCGCAAAT	CGCGTCAAGG	AAAC-GAAA-	CGCAAGAGCC	CGCTC- CCA
E. oblongifolium	GTCGTGCTCT	CGATAT-CA-	CAACGAACCC	CGGCGCAAAA	CGCGTCAAGG	AAAC-GCAA-	TGCAAGAGCA	TGCTC--CCA
L. styraciflua	GTCGTGTTCT	CGGCCC-CA-	TAACGAACCC	CGGCGCAAGC	CGCGCCAAGG	AAAC-TCAA-	CGCGAGAGCA	TGCGCGCCCG

图1 四药门药属及其近缘植物核糖体 DNA ITS 区与 5.8S 区序列

Fig. 1 Sequence alignment of the ITS and 5.8S regions of *Tetrathyrium* and the other related genus of Hamamelidaceae

```
                                                                                  ITS1'5.8S
                    2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222223 3333333333 3333333333
                    4444444445 5555555556 6666666667 7777777778 8888888889 9999999990 0000000001 1111111112
                    1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890

D. cercidifolius v. -TGCCCCGTT CTCGGGACGC CCGGGGGGTA GTGCAATCTT CGATAT --AT  CTTAACGAC TCTCGGCAAC GGATATCTCG
R. championii       CTCG CCGAT CTCGGGGCGT GCGGGCGGCT GTGTTATCTT CGA-A---AT -CTTAACGAC TCTCGGCAAC GGATATCTCG
H. mollis           TC CCCCGGT CTCGGGTCGT GGTGGGGGCA ATGGCATCTT CGATAT-TAT TCTAAACGAC TCTCGGCAAC GGATATCTCG
F. major            TC CCCCGGT CTCGGGTCGT GGTGGGGGCA TTGGCATCTT CGATAT-TAT TCTAAACGAC TCTCGGCAAC GGATATCTCG
S. subaequale       TC CCCCGGT CTCGGGTCGT GGTGGGGGCG ATGGCATCTT CGATAT-TAT ACTAAACGAC TCTCGGCAAC GGATATCTCG
Sin. henryi         TC CCCCGGT CCCGGGTCGT GGTGGGGGCA ACGGCATCTT CGATAT-TAT TCTAAACGAC TCTCGGCAAC GGATATCTCG
T. subcordatum      TC CCCCGGT CACGGGTGCC GGTGGGGGCA ATGGCTTCTT CGATAT-TAT TCTAAACGAC TCTCGGCAAC GGATATCTCG
Lor. chinense       TC CCCCGGT CACGGGTGCC GGTGGGGGCA ATCGCTTCTT CGATAT-TAT TCTAAACGAC TCTCGGCAAC GGATATCTCG
For. sinensis       TC CCCCGGT CTCGGGCCGT GGTGGGGGCA ATGGCATCTT CGATAT-TAT TCTAAACGAC TCTCGGCAAC GGATATCTCG
C. claborescens     TC GCCCGGT CACGGGTTTT GGTGGGGGCA ATGTCATCTT CGATAT-TAT TCTAAACGAC TCTCGGCAAC GGATATCTCG
Syc. sinensis       TC CCCCGGT CTCGGGTCGT GGTGGGGGCG AAGGCATCTT CGATAT TAT ACTAAACGAC TCTCGGCAAC GGATATCTCG
E. oblongifolium    TC CCCCGGT CTCGGGTCGT GGTGGGGGCA ATGGCATCTT CGATAT-TAT TCTAAACGAC TCTCGGCAAC GGATATCTCG
L. styraciflua      CCGCTCCGGT CTCGGGGCGT GCGGGAGGCG GTGCGATCTT GTATGCGTAC ACTAAACGAC TCTCGGCAAC GGATATCTCG
```

```
                    3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333334
                    2222222223 3333333334 4444444445 5555555556 6666666667 7777777778 8888888889 9999999990
                    1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890

D. cercidifolius v. GCTCTCGCAT CGATGAAGAA CGTAGCGAAA TGCGATACTT GGTGTGAATT GCAGAATCCC GTGAACCATC GAGTTTTTGA
R. championii       CGTCTCGCAT CGATGAAGAA CGTAGCGAAA TGCGATACTT GGTGTGAATT GCAGAATCCC GTGAACCATC GAGTCTTTGA
H. mollis           CGTCTCGCAT CGATGAAGAA CGTAGCGAAA TGCGATACTT GGTGTGAATT GCAGAATCCC GTGAACCnnn nnnnnnnnnn
F. major            CGTCTCGCAT CGATGAAGAA CGTAGCGAAA TGCGATACTT GGTGTGAATT GCAGAATCCC GTGAACCATC GAGTCTT-GA
S. subaequale       CGTCTCGCAT CGATGAAGAA CGTAGCGAAA TGCGATACTT GGTGTGAATT GCAGAATCCC GTGAACCATC GAGTCTTTGA
Sin. henryi         CGTCTCGCAT CGATGAAGAA CGTAGCGAAA TGCGATACTT GGTGTGAATT GCAGAATCCC GTGAACCATC GAGTCTTTGA
T. subcordatum      CGTCTCGCAT CGATGAAGAA CGTAGCGAAA TGCGATACTT GGTGTGAATT GCAGAATCCC GTGAACCATC GAGTCTTTGA
Lor. chinense       CGTCTCGCAT CGATGAAGAA CGTAGCGAAA TGCGATACTT GGTGTGAATT GCAGAATCCn nnnnnnnnnn nnnnnnnnGA
For. sinensis       CGTCTCGCAT CGATGAAGAA CGTAGCGAAA TGCGATACTT GGTGTGAATT GCAGAATCCC GTGAACCATC GAGTCTT GA
C. claborescens     CGTCTCGCAT CGATGAAGAA CGTAGCGAAA TGCGATACTT GGTGTGAATT GCAGAATCCC GTGAACCATC GAGTCTTTGA
Syc. sinensis       GCTCTCGCAT CGATGAAGAA CGTAGCGAAA TGCGATACTT GGTGTGAATT GCAGAATCCC GTGAACCATC GAGTCTT-GA
E. oblongifolium    GCTCTCGCAT CGATGAAGAA CGTAGCGAAA TGCGATACTT GGTGTGAATT GCAGAATCCC GTGAACCATC GAGTCTTTGA
L. styraciflua      CGTCTCGCAT CGATGAAGAA CGTAGCGAAA TGCGATACTT GGTGTGAATT GCAGAATCCC GTGAACCATC GAGT-TTTGA
```

```
                                                                       5.8S'ITS2
                    4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444
                    0000000001 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 5555555556 6666666667 7777777778
                    1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890

D. cercidifolius v. ACGCAAGTTG CGCCCGAAGC CATTAGGCCG AGGGCACGTC TGCCTGGGCG TCACGTATTG CGTTGCCCCC CCAAT CCCC
R. championii       ACGCAAGTTG CGCCCGAAGC CATTAGGCCG AGGGCACGTC TGCCTGGGCG TCACGTATCA CGTCGCCCCC ACAAAACCTC
H. mollis           nnnnnnnTTG CGCCCAAAGC CATTAGGCCG AGGGCACGTC TGCCTGGGCG TCACGTATCG CGTCGCCACC CCAA-CCCGC
F. major            ACGCAAGTTG CGCCCAAAGC CATTAGGCCG AGGGCACGTC TGCCTGGGCG TCACGTATCG CGTCGCCACC CCAA CCCCC
S. subaequale       ACGCAAGTTG CGCCCAAAGC CATTAGGCCG AGGGCACGTC TGCCTGGGCG TCACGTATCG CGTCGCCACC CCAA-CCCCC
Sin. henryi         ACGCAAGTTG CGCCCAAAGC CATTAGGCCG AGGGCACGTC TGCCTGGGCG TCACGTATCG CGTCGCCCCC ACAAACCCTT
T. subcordatum      ACGCAAGTTG CGCCCGAAGC CATTAGGCCG AGGGCACGTC TGCCTGG-CG TCACGCATCG CGTCGCCnCC CCAA- CCCT
Lor. chinense       ACGCAAGTTG CGCCCAAAGC CATTAGGCCG AGGGCACGTC TGCCTGGGCG TCACGCATCG CGTCGCCCCC CCAA  CCCT
For. sinensis       ACGCAAGTTG CGCCCAAAGC CATTAGGCCG AGGGCACGCC TGCCTGGGCG TCACGTATCG CGTCGCCCCC ACAA  CCCC
C. claborescens     ACGCAAGTTG CGCCCAAAGC CATTAGGCCG AGGGCACGTC TGCCTGGGCG TCACGTATCG CGTCGCCCCC C AA  CCTC
Syc. sinensis       ACGCAAGTTG CGCCCAAAGC CATTAGGCCG AGGGCACGTC TGCCTGGGCG TCACGTATCG CGTCGCCACC CCAA CCCCC
E. oblongifolium    ACGCAAGTTG CGCCCAAAGC CATTAGGCCG AGGGCACGTC TGCCTGG-CG TCACGTATCG CGTCGCCCCC ACAA  CCCC
L. styraciflua      ACGCAAGTTG CGCCCGAAGC CATTAGGCCG AGGGCACGTC TGCCTGG CG TCACGCATCG CGTCGCC CC CCGAACCCC
```

图 1　续

Fig. 1 Continued

```
                     4444444444 4444444445 5555555555 5555555555 5555555555 5555555555 5555555555 5555555555
                     8888888889 9999999990 0000000001 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 5555555556
                     1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890

D. cercidifolius v.  G CCACGGAT CCCGTGGTGC GTGGCCTTT- ATGTGGGGGC GGATACTGGC CTCCCGTTCA CTCTGCGGT  GCGGTTGGCT
R. championi         ATCCACGTTG CTCGTGGTGC GGGG-ATTTG A-GCGGAG C GGATATTGGT CTCCCGTGCA  TCC CGTT  GCGGTTGGCC
H. mollis            G  CACGTAT ACCGTGCCGC GGGGCAT -C ATGTGGGGGC GGATATTGGC CTCC  CGTG C ACTTCGCC GCGGTTGGCC
F. major             GCCCACGTAT ATCGTGCCGC GGGGCGT -C ATGTGGGGGC GGATATTGGC CTCC  CGTG C-ACTTCGCC GCGGTTGGCC
S. subaequale        GCCCACGCAT GCCGTGATGC GGGGCGT  C CTGTGGGGGC GGATATTGGC CTCC  CGTG C ACTTCGCC GCGGTTGGCC
Sin. henryi          TCCCACGTAT ATCGTGGCTG GTGGCATTAT ATGTGGGGGC GGAGATTGGC CTCC  CGTG C CCCGCGCA GCGGTTGGCC
T. subcordatum       GCCCACGCAA GCCGTGGTGC GGGGCAT  C GTGCGGGGGC GGATACTGGC CTCC  CGTG C ACCGCGCT GCGGTTGGCC
Lor. chinense        TCCCACGCAC GCCGTGGTGA TGGGCGC  C ATGCGGGGGC GGAGATTGGC CTCC  CGTG C ACCGCGCT GCGGTTGGCC
For. sinensis        GCACACGTAC ACCGTGGAGA GGGGCATTAT ATGTGGGGGC GGAGATTGGC CTCC -CGTG C ACCGCGCC GCGGTTGGCC
C. claborescens      GCCCACGTCC GACGTGGTGC GGGGCAT  T ATGCGGGGGC GGATATTGGC CTCC  CGTG CGATTGCGCT GCGGTTGGCC
Syc. sinensis        GTCCACGTAT GCCGTGATGC GGGGCGT  C CTGTGGGGGC GGATATTGGC CTCC  CGTG C ACTTCGCC GCGGTTGGCC
E. oblongifolium     GCCCACGTAT ATCGTGGAGA GGGGCAC AC ACGTGGGGGC GGATATTGGC CTCC -CGTG C ACTGCGCC GCGGTTGGCC
L. styraciflua       GCCCGCCCTC G  GTGGCGC GGGGCTCCGC G   GGGAGC GGAGATTGGC CTCC GTGAA CCACGGTGTC GCGGTTGGCT

                     5555555555 5555555555 5555555555 5555555556 6666666666 6666666666 6666666666 6666666666
                     6666666667 7777777778 8888888889 9999999990 0000000001 1111111112 2222222223 3333333334
                     1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890

D. cercidifolius v.  TAAAAACGAG CCCCGAGCGT C GAACGTCA  CG      AC AAGTGGTGGT TGTTAA CCC CGACCTTTGC GG  TGTCGT
R. championi         TAAAAATCGG TCCCGAGCGA C GAACGTCA  CG --   AC AAGTGGTGGT TGACAGGCCT CGGCCTCAGC GG  TATCGT
H. mollis            TAAAAGCGAG CCCCGGGCGA CAGA       ACGTCACGAT AAGTGGTGGT TGATAAGCCC CGGC CCTTG AA GTGTCAT
F. major             TAAAAGCGAG CCCCGGGCGA CAGA       ACGTCACGAT AAGTGGTGGT TGATAAGCCC CGGC CCTTC AA GTGTCAT
S. subaequale        TAAAAGCGAG CCCCGGGCGA CAGA       ACGTCACGAT AAGTGGTGGT TGATAAGCCC CGGC CCTTC AA GTGTCAT
Sin. henryi          TAAAAGAGAG CCCCGGGCGA CAGA       ACGTCACGAT AAGTGGTGGT TGATAAGCCC CGGC CCTTC AA GTGTCGA
T. subcordatum       TAAAAACGAG CCCCGGGCGA CAGA       ACGTCACGAT AAGTGGTGGT CTACAAGCCC CGAC CCTCT CA GTGTCGT
Lor. chinense        TAAAAACGAG CCCCGGGCGG CAGA       ACGTCACGAT GAGTGGTGGT TTACAAGCCC CGAT CCGGA AACGTGTCGT
For. sinensis        TAAAAGCGAG CCCCGGGCGA CAGA       ACGTCACGAT AAGTGGTGGT TGATAAGCCC CGGC CCTTC AA GTGTCGT
C. claborescens      TAAAAGCGAG CCCCGGGCGA CAGA       ACGTCACGAT AAGTGGTGGT TTATAAGCCC CGAC-CCTTG CA GTGTCGT
Syc. sinensis        TAAAAGCGAG CCCCGGGCGA CAGA       ACGTCACGAT AAGTGGTGGT TGATAAGCCC CGGC CCTTC AA GTGTCAT
E. oblongifolium     TAAAAGCGAG CCCCGGGCGA CAGA       ACGTCACGAT AAGTGGTGGT TGATAGGCCC CGAC CCTTC AA GTGTCGT
L. styraciflua       TAAAAGCGTG CCCCGGGCGA CGAA CGCCA ACGTCTCAAG CAGTGGTGGT TAGCAAACCC CGGCATCGAC GATGT TTGC

                                                                                   ITS2|26S
                     6666666666 6666666666 6666666666 6666666666 6666666666 6666666667 7777777777 7777777777 7777
                     4444444445 5555555556 6666666667 7777777778 8888888889 9999999990 0000000001 1111111112 2222
                     1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234

D. cercidifolius v.  G      CGT TGTCCCGTCG CTCGCTGGTG CTGC GTGAC CCCG  ATGC TCCGTCGAAT GGCGGTGCTT CCATCGCGAC CCCA
R. championi         G TCGTGCGT TTTCCCGTCG CTCGTCGGAG CGAACGAGAC CCCG  ATGC GTCGCCCC G ACGGATGCTT CCATCGCGAC CCCA
H. mollis            GT CGTGCGT TGCCCTGTCG CTCGTTGGAG CTA-CGAGAC CCCGAT  GC GTCGTCCC   GACGATGCTT CCATCGCGAC CCCA
F. major             GT CGTGCGT TGCCCTGTCG CTCGTTGGAG CTA-CGAGAC CCCGAT  GC GTCGTCCC   GACGATGCTT CCATCGCGAC CCCA
S. subaequale        GT CGTGCGT TGCCCTGTCG CCCGCTGGAG CTA CGAGAC CCCGAT  GC GTCGTCCC   GACGATGCTT CCATCGCGAC CCCA
Sin. henryi          GT CGTGCGT TGCGCTGTCG CCTGTTGGAG CTA-CGAGAC CCCGAT  GC GTCGTCCC   GACGATGCTT CCATCGCGAC CCCA
T. subcordatum       GT CGTGCGT TGCACTGTCG CCCGCTGGAG CCA-CGAGAC CCCGAT  GC ACCGCAAC   CnCGGTGCTT CCATCGCGAC CCCA
Lor. chinense        GT CGTGCGT TGCACTGTCG CCCGCTGGAG CCA-CGAGAC CCCGAT- GC GCCGCAAC   CACGGTGCTT CCATCGCGAC CCCA
For. sinensis        GT CGTGCGT TGCGCTGTCG CCTGTCGGAG CCA-CGAGAC CCCGAT  GC GTCGTCCC   GACGATGCTT CCATCGCGAC CCCA
C. claborescens      GT CGTGCGT TGCACTGTCG CTCGTTGGAG CTAATGAGAC CCCGAT  GC GCCGTGCC   GACGGTGCTT CCATCGCGAC CCCA
Syc. sinensis        GT CGTGCGT TGCCCTGTCG CCCGTTGGAG CTA CGAGAC CCCGAT- GC GTCGTCCC   GACGATGCTT CCATCGCGAC CCCA
E. oblongifolium     GT CGTGCGT TGCGCTGTCG CCTGTTGGAG CTA-CGAGAC CCCGAT- GC GTCGTCCC   GACGATGCTT CCATCGCGAC CCCA
L. styraciflua       CT TGTGCGT TGCCTCGTCG CCCG  AGAC ACAGAGACCC CGTAAC  GC GTCGCACA   CGCGGCGTTT CCATCGCGAC CCCA
```

图1 续

Fig. 1 Continued

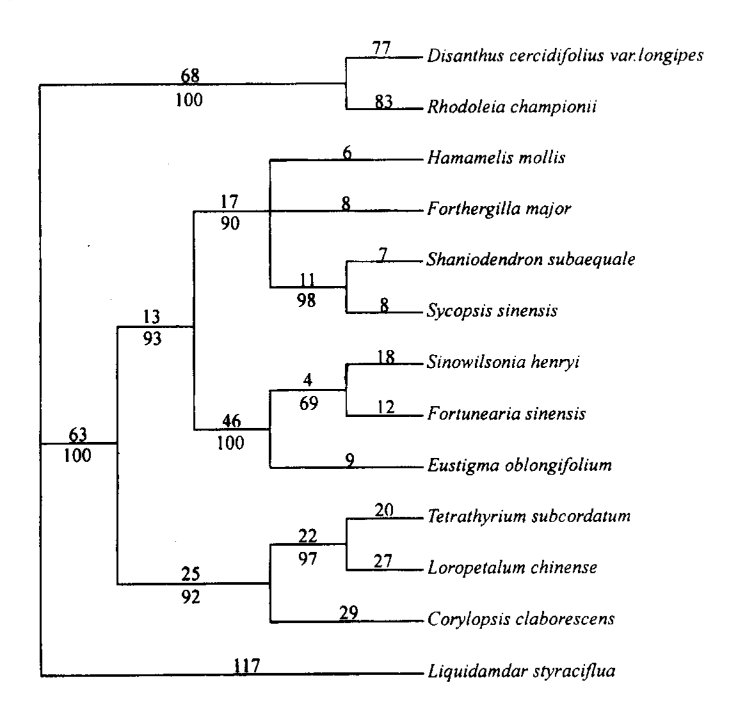


图 2　金缕梅亚科严格一致系统树，线上的数字代表分支长度；线下的数字代表各分支的自展数据支持率（100 次抽样重复的 bootstrap 值）

Fig. 2 The strict consensus tree of the two most parsimonious trees of Hamamelidoideae based on the ITS sequences of nrDNA (690 steps, CI = 0.775, RI = 0.670, RC = 0.520). The numbers above the lines indicate branch lengthes. Bootstrap values in 100 replicated were indicated below each branch

2 结果

测序结果列于图 1 中。总长 724bp 的序列分析表明，在金缕梅亚科内 ITS 区总长度（ITS－1 和 ITS－2）为 473～507bp。5.8S 区长度在 164～165bp。令人注意的是，牛鼻栓（*Fortunearia sinensis*）、山白树（*Sinowilsonia henryi*）、秀柱花（*Eustigma oblongifolium*）同时存在一段长达 38bp 的缺失。用 PAUP 3.1.1 获得各类群的核苷酸差异数及 Knuc 值列于表 2 中。可以看出；在金缕梅亚科内，Knuc 值变化范围为 2.0%（*Fothergilla* 与 *Hamamelis* 之间）到 17.2%（*Loropetalum* 与 *Sinowilsonia* 之间）。亚科内的 Knuc 值均小于 20%；而亚科间的 Knuc 值均大于 20%，即从 22.1%（*Disanthus* 与 *Rhodoleia* 之间）到 31.2%（*Disanthus* 与 *Liquidamdar* 之间）。这从一个方面显示了金缕梅科内各亚科之间的相对独立性以及金缕梅亚科内复系演化（ploypheletic）的特征。在此基础上，通过分支分析获得 2 棵最大简约树（MPTs），其严格一致树（Strict Consensus Tree）以及各分支长度和各分支的自展数据支持率见图 2。

3 讨论

ITS 系统树表明，实验所测定的金缕梅亚科的所有种类形成一个单系类群（monophyletic group），这一结果得到了 100%的自展数据值的支持（图 2）。而在亚科内的类群间

则表现为复系演化（ployphyletic）特征。事实上，金缕梅亚科内的系统演化关系一直存在着较大的争议（张宏达，1979；Bogle，1970；Hams，1930）。Endress（1989）根据形态学特征将该亚科划分为4个族：金缕梅族（Hamamelideae），蜡瓣花族（Corylopsideae），秀柱花族（Eustigmateae），弗特吉族（Fothergilleae）。Endress将Eustigmateae这一单属的族扩展为3个属：*Eustigma*，*Fortunearia* 和 *Sinowilsonia* 。在本研究所得到的ITS系统树中，这3个属为姐妹群，形成一个单系分支（自展数据支持率为100%，图2）。此结果支持将传统分类中属于Corylopsideae的Fortunearia以及Fothergilleae的 *Sinowilsonia* 归入Eustigmateae的观点。此外，在整个金缕梅科的核糖体DNA ITS区序列中，唯有这3个属在ITS-1区存在一段38bp（114位～151位）的碱基缺失（图1），这一特征从另一侧面反映了这3个属的关系密切，进一步支持了该族成立的观点。

Endress（1989）在其系统中，根据形态学和遗传学的证据，将蚊母树族（Distylieae）归并入Fothergilleae。ITS区序列的系统树表明，Distylieae的Sycopsis与Fothergilleae的 *Shaniodendron* 形成一个单系类群（自展数据集支持率为98%，图2）。两者之间的ITS序列差异值也较低，仅为2．1%（表2），这一结果再一次支持Distylieae与Fothergilleae合并的观点（Endress，1989，李建华等，1997）。ITS序列分析的结果还表明，*Shaniodendron* 与 *Sycopsis*，*Fothergilla* 和 *Hamamelis* 这3个属的关系较近，所构成的姐妹群关系也获得了90%的自展数据支持率。*Shaniodendron* 是1992年新建立的单种属（邓懋彬等，1992），根据 *Shaniodendron* 缺少花瓣等形态学特征，有人建议将它放入金缕梅亚科中的无花瓣类群（郝日明等，1996），即归入Fothergilleae。本研究的结果与这一观点较为接近。

从本研究所得到的ITS系统树还可以看出，*Hamamelis* 与Fothergilleae也有着较为亲近的系统发育关系。*Hamamelis* 与 *Fothergilla*，*Shaniodendron* 和 *Sycopsis* 这3个属间的核苷酸差异值相当小（2.0%－3.4%），为该属与本亚科中其它属的Knuc值中最小的。在系统树中表现为同一姐妹群关系（图2）。从 *Hamamelis* 与另外两个族（Eustigmateae和Corylopsideae）的关系来看，该属与Eustigmateae关系较近，而与Corylopsideae关系较远，这与解剖学及形态学的结论相一致（张宏达，1995）。

值得注意的是，在本研究的ITS系统树中，Hamamelideae内部也同样表现出复系演化的特征。Endress（1989）将Hamamelideae划分为3个亚族：金缕梅亚族（Hamamelidinae）、檵木亚族（Loropetalinae）和Dicoryphinae。*Tetrathyrium* 与 *Loropetalum* 同属于Loropetalinae。本研究的结果表明，*Tetrathyrium* 与 *Loropetalum* 形成一个单系类群（97%的自展数据支持率）（图2），因而支持将它们归入同一亚族的观点。另一方面，ITS系统树还表明，*Tetrathyrium*，*Loropetalum* 与同一族的 *Hamamelis* 之间却关系甚远，它们之间的核苷酸差异值较 *Hamamelis* 与金缕梅亚科其它属的差异都更大（为11.7%～12.6%，表2）它们各自与不同的族（Fothergilleae与Corylopsideae）形成姐妹群关系。形态发育学的证据曾表明Hamamelis与Loropetalum的花器官在个体发育上差异很大（Miore *et al*，1987）。张宏达（1962）认为在解剖学及形态学上，*Tetrathyrium* 是金缕梅亚科中最原始的一个属。他认为 *Loropetalum* 和 *Tetrathyrium* 非常接近，也是本亚科中较原始的类群。而 *Hamamelis* 在系统发育上则比以上2个属处于较进化的位置，本研究的结果支持了上述结论。此意味着 *Tetrathyrium* 和 *Loropetalum* 所组成的Loropetalinae与Hamamelidinae（只含 *Hamamelis* ）同归

入Hamamelideae的意见得不到核糖体DNA ITS序列分析结果的支持。另外，在ITS系统树图中，Loropetalinae与Corylopsideae表现为姐妹群关系（Branch length为29，图2）。虽然两者在解剖学上都具有非常原始的次生木质部，导管多梯形穿孔，木薄壁组织贫乏等，具有一定的相似性，但是两者在花的形态上明显不同（Weaver，1976）。在本研究的ITS序列中，Loropetalinae与Corylopsideae的核苷酸差异值也较大（9.4%～10.6%，表2），因此Loropetalinae能否归入Corylopsideae仍然需要更深入的研究。从另外一个角度来看，Loropetalinae和Hamamelidinae在分子系统树中的位置可能反映了它们在进化中的不同地位。与形态解剖学上的证据相一致（张宏达，1995），Loropetalinae代表了原始的类群从而接近Corylopsideae；而Hamamelidinae则代表了相对更进化的类群而靠近Fothergilleae。因此，将两者同放在Hamamelideae中这一意见有待于商榷。比较而言，将Loropetalinae另立为一族更能得到分子数据的支持。总之，金缕梅亚科中Hamamelideae的界限是一个很值得深入探讨的问题。进一步的研究可以围绕两个方面来进行，一是扩大样品的种类，引入该族其它属的ITS数据；二是与其它分子标记（如叶绿体DNA *matK*基因等）相结合来共同探讨。

致谢 本研究承中科院华南植物研究所邢福武、刘念研究员，南京林业大学李湘萍老师，江苏植物研究所郝日明先生提供部分实验材料。

参考文献

邓懋彬，魏宏图，王希蕖，1992. 银缕梅属——中国金缕梅一新属. 植物分类学报，**30**（1）：57～61

李建华，Bogle A L，Klein A S，*et al*，1997. 金缕梅科银缕梅属与帕罗堤属的亲缘关系—核糖体DNA ITS序列证据. 植物分类学报，**35**（6）：481～493

张宏达，1962. 广东植物区系的特点. 中山大学学报（自然科学版），**1**：35～44

张宏达，1979. 金缕梅科. 中国植物志35卷第2分册. 北京：科学出版社，36～116

张宏达，王伯荪，胡玉佳等，1989. 香港植被. 中山大学学报论丛，**8**（2）：113～117

张宏达，1995. 金缕梅科的植物区系分析. 见：《张宏达文集》编辑组编辑. 张宏达文集. 广州：中山大学出版社，188～196

郝日明，魏宏图，刘晚苟，1996. 银缕梅属花形态及其分类学意义. 植物资源与环境，**5**（1）：38～42

Bogle A L, 1970. Floral morphology and vascular anatomy of the Hamamelidaceae: the apetalous genera of Hamamelidaceae. *J Arnold Arbor*, **51**: 330～366

Doyle J J, Doyle J L, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material. *Phytochem Bull*, **19**: 11

Endress P K, 1989. A suprageneric taxonomic classification of the Hamamelidaceae. *Taxon*, **38** (3): 371～376

Harms H, 1930. Hamamelidaceae. In: Engler A and Prantl K, eds. Die Naturlichen Pflanzenfamilien. Band 18a. Leipzig: Verlag von Wilhelm Engelmann, 303～345

Mione T, Bogle A L, 1987. Comparative ontogeny of the flowers of *Hamamelis viriginana* and *Loropetalum chinense* (Hamamelidaceae). *Am J Bot*, **74**: 620～621

Sanger F, Nicklen S, Coulson A R, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **74**: 5463

Shi S H, Chang H T, Chen Y Q *et al*, 1998. Phylogeny of the Hamamelidaceae based on the ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Biochem Syst Evol*, **25**: 55～69

Swofford D L, 1993. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version 3. 1. 1. Illinois Natural History Survey. Champaign. IL.

Thompson J D, Gibson T J, Plewnaik F *et al*, 1997. The Clustalx windows intenface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, **25** (24): 4876～4882

Weaver R E Jr., 1976. The witch hazel family (Hamamelidaceae). *Arnoldia*, **36** (3): 69～109

Wen J, Zimmer E A, 1996. Phylogeny and biogeography of Panax L. (the ginseng genus, Araliaceae): inferences from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Mol Phylogenet Evol*, **6**: 166～177